

Lekowrażliwość szczepów *Gardnerella vaginalis* wyizolowanych z przypadków bakteryjnej waginozy

Antibiotic resistance of *Gardnerella vaginalis* isolated from cases of bacterial vaginosis

Tomusiak Anna, Strus Magdalena, Heczko Piotr Bogumił

Katedra Mikrobiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, Polska

Streszczenie

Wstęp: *Gardnerella vaginalis* jest jednym z najczęstszych czynników etiologicznych bakteryjnej waginozy i drobnoustrojem wskaźnikowym dla tego schorzenia. W literaturze światowej coraz częściej pojawiają się doniesienia mówiące o narastającej częstości występowania szczepów tego gatunku opornych na metronidazol.

Cel pracy: Celem pracy było sprawdzenie wrażliwości szczepów *Gardnerella vaginalis* wyizolowanych od kobiet ze zdiagnozowaną bakteryjną waginozą na metronidazol, klindamycynę i amoksycylinę z kwasem klawulanowym.

Materiał i metody: Badanie przeprowadzono na kolekcji 67 szczepów *Gardnerella vaginalis* wyizolowanych z grupy 604 kobiet uczestniczących w badaniu. Wrażliwość szczepów na antybiotyki oznaczana była metodą E-test (BioMerieux). W interpretacji wyników kierowano się kryteriami EUCAST.

Wyniki: Wszystkie badane szczepy, poza jednym, były wrażliwe na klindamycynę oraz amoksycylinę z kwasem klawulanowym. Aż 68,7% (46 z 67 badanych) szczepów charakteryzowało się opornością na metronidazol.

Wnioski: W niedługim czasie może zaistnieć potrzeba zmiany schematów dotyczących leczenia bakteryjnej waginozy.

Słowa kluczowe: **wrażliwość na antybiotyki / bakteryjna waginoza /
/ *Gardnerella vaginalis* /**

Adres do korespondencji:

Anna Tomusiak
Katedra Mikrobiologii Collegium Medicum UJ w Krakowie
Polska, 31-121 Kraków, ul. Czysta 18
tel. 663 359 151
fax. (12) 423 39 24
e-mail: atomusiak@student.cm-uj.krakow.pl

Otrzymano: 30.08.2011
Zaakceptowano do druku: 14.11.2011

Summary

Introduction: *Gardnerella vaginalis* is one of the dominant etiological factors related to bacterial vaginosis. Literature offers a growing number of reports revealing there appear *Gardnerella vaginalis* strains increasingly resistant to metronidazole.

Objectives: The aim of this study was to determine the susceptibility of *Gardnerella vaginalis* strains isolated from women with bacterial vaginosis to metronidazole, clindamycin and amoxicillin/clavulanic acid.

Material and methods: The investigation was performed on collection of 67 *Gardnerella vaginalis* strains isolated from the group of 604 women participating in the study. Antibiotic sensitivity of strains was verified by E-test method (BioMerieux). Interpretation of results was performed in accordance with EUCAST criteria.

Results: All tested strains, apart from one, were sensitive to clindamycin and amoxicillin/clavulanic acid. The results of susceptibility test to metronidazole indicated that 68,7% (46 out of 67 strains) were resistant to this antibiotic, while all of them were sensitive to both clindamycin and amoxicillin/clavulanic acid.

Conclusions: Near future may bring the need to change the treatment regimen of bacterial vaginosis.

Key words: **antibiotic susceptibility / bacterial vaginosis / *Gardnerella vaginalis* /**

Wstęp

Bakteryjna waginoza (*bacterial vaginosis*, BV), będąca konsekwencją ilościowych zaburzeń składu flory bakteryjnej pochwy, jest jedną z najczęstszych przyczyn wizyt kobiet u lekarzy ginekologów. Szacuje się, iż częstość występowania tej jednostki chorobowej u kobiet w okresie dojrzałości płciowej wynosi 10-40% [1]. W przebiegu BV dochodzi do redukcji liczebności lub nawet całkowitego zaniku populacji laseczek z rodzaju *Lactobacillus*, a w zamian następuje niekontrolowane namnażanie się bakterii ściśle beztlenowych. Najczęściej izolowanym patogenem w przypadkach BV jest *Gardnerella vaginalis*, która występuje niemal u wszystkich kobiet z tą przypadłością. Podobnie jest w przypadku innego beztlenowca *Atopobium vaginae*. Pałeczka *Mobiluncus spp.* występuje wprawdzie tylko u kobiet z BV, ale zaledwie w 50% przypadków [2]. W zwiększonej liczbie od kobiet z BV izolowane są także inne beztlenowce, takie jak *Peptostreptococcus spp.*, *Prevotella spp.*, *Bacteroides spp.*, czy *Clostridium spp.* [3]. Ostatnio coraz częściej BV wymieniana jest wśród czynników zwiększających ryzyko zakażenia powodowanego *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* i HIV [4,5]. Ponadto u kobiet ciężarnych BV podnosi ryzyko późnych poronień, przedwczesnych porodów oraz innych zakażeń okołoporodowych [6,7].

W leczeniu BV powszechnie i rutynowo stosowane są metronidazol lub klindamycyna, które podawane są w postaci preparatów doustnych albo dopochwowych. Według danych z literatury medycznej, skuteczność terapeutyczna preparatów doustnych po tygodniowym okresie kuracji wynosi dla metronidazolu 84-96%, a dla klindamycyny 94% [8]. W przypadku preparatów dopochwowych pozytywne efekty stosowania metronidazolu i klindamycyny obserwuje się odpowiednio u 75% i 86% kobiet [9]. Pomimo dużej skuteczności tych antybiotyków dość często obserwowane są nawroty BV. Szacuje się, że u ok. 30% kobiet ponowne objawy kliniczne BV pojawiają się po 3 miesiącach, a u ok. 80% w ciągu pierwszego roku od momentu zakończenia leczenia [10,11]. Jedną z przyczyn nawrotów może być oporność szczepów bakterii beztlenowych na zastosowany antybiotyk.

Jak podaje literatura takie drobnoustroje jak *Mobiluncus spp.*, czy *Atopobium vaginae* izolowane od kobiet z rozpoznany

BV są często wysoce odporne na metronidazol [2, 12, 13]. Coraz częściej pojawiają się również doniesienia dotyczące oporności *Gardnerella vaginalis*, które wskazują na zwiększający się odsetek szczepów tego gatunku opornych na wspomniany antybiotyk. W badaniach przeprowadzonych w ostatnim czasie zaobserwowano oporność szczepów *Gardnerella vaginalis* na metronidazol sięgającą aż 70% [14, 15]. Klindamycyna w porównaniu do metronidazolu charakteryzuje się większą skutecznością wobec beztlenowych pałeczek Gram-ujemnych, jednak negatywną stroną stosowania tego antybiotyku jest jego zdolność do hamowania wzrostu bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, co może zaburzać proces odtwarzania prawidłowego ekosystemu pochwy [16].

Proponowanym lekiem drugiego rzutu w terapii BV jest amoksycylina z kwasem klawulanowym [3]. Niestety w literaturze brakuje danych dotyczących oceny skuteczności tego antybiotyku w leczeniu zakażeń pochwy wywołanych przez bakterie beztlenowe. Jedno z takich badań, które zostało przeprowadzone w grupie 28 kobiet z rozpoznaną bakteryjną waginozą wykazało, iż amoksycylina z kwasem klawulanowym charakteryzuje się dużą aktywnością wobec bakterii *Gardnerella vaginalis* i innych beztlenowców przynosząc jednocześnie pozytywne efekty lecznicze [17].

Niepokojący wzrost liczby szczepów bakterii beztlenowych związanych z BV, które wykazują oporność na metronidazol może za kilka lat doprowadzić do zmiany schematów dotyczących leczenia BV.

Cel pracy

Celem niniejszej pracy było sprawdzenie wrażliwości szczepów *Gardnerella vaginalis*, jako gatunku najczęściej izolowanego w naszej populacji z przypadków BV, na metronidazol, klindamycynę i amoksycylinę z kwasem klawulanowym, aby uzyskać dane uzasadniające ewentualne rozważenie potrzeby zmiany dotychczasowych zaleceń w zakresie leczenia BV.

Materiał i metody

W badaniu wzięły udział 604 kobiety zamieszkujące teren Polski południowo-wschodniej, w wieku od 18 do 50 lat, które zgłosiły się do lekarza ginekologa z objawami stanu zapalnego

dróg rodnych, bądź też do rutynowej kontroli w trakcie ciąży. Materiały do badań mikrobiologicznych pobierane były od wszystkich kobiet w ambulatorium Pracowni Diagnostycznej Katedry Mikrobiologii UJ CM. Analizie mikrobiologicznej poddawane były wymazy pobierane z tylnego sklepienia pochwy za pomocą jałowych wacików. Ocena stanu flory bakteryjnej pochwy przeprowadzana była na podstawie pomiaru pH środowiska pochwy oraz na podstawie oceny preparatu barwionego metodą Grama zgodnie z dziesięciopunktową skalą Nugenta, gdzie wynik od 0 do 3 punktów odpowiada prawidłowej florze bakteryjnej, wynik zawierający się między 4 a 6 punktami odpowiada tzw. florze przejściowej, natomiast wynik od 7 do 10 punktów wskazuje na BV [18].

Wszystkie wymazy pobrane z tylnego sklepienia pochwy wysiewane były na podłoża wzrostowe dla bakterii i grzybów. W tym celu materiał wyjściowy umieszczano w 1 ml płynnego podłoża Schädlera (Difco), całość dokładnie mieszano, a następnie wykonywano seryjne dziesiętne rozcieńczenia, które wysiewano na stałe podłoża różniące dla bakterii tlenowych, beztlenowych i grzybów. Bakterie tlenowe hodowane były na podłożu Columbia Agar (Difco) z 5% krwi baraniej, natomiast do hodowli pałeczek z rodzaju *Enterobacteriaceae* zastosowano podłoże Mac Conkey'a (Biocorp). Hodowla prowadzona była w temperaturze 37°C przez 24 godziny w warunkach tlenowych. Hodowlę ściśle beztlenowych bakterii prowadzono na podłożu agarowym Schädlera (Difco) z witaminą K i 5% krwi baraniej, zaś do hodowli bakterii z gatunku *Gardnerella vaginalis* wykorzystano podłoże Columbia Blood Agar Base (Difco) z 10% krwi ludzkiej i z dodatkiem odżywczym Selective Supplement (Oxoid). Hodowla flory beztlenowej prowadzona była w ściśle beztlenowych warunkach w komorze MACS (Don Whitley) w temperaturze 37°C przez 48 godzin. W celu wykrycia obecności grzybów drożdżopodobnych badane materiały wysiewane były na podłoże Sabouraud Agar (Difco) i inkubowane w 37°C przez 48 godzin w warunkach tlenowych.

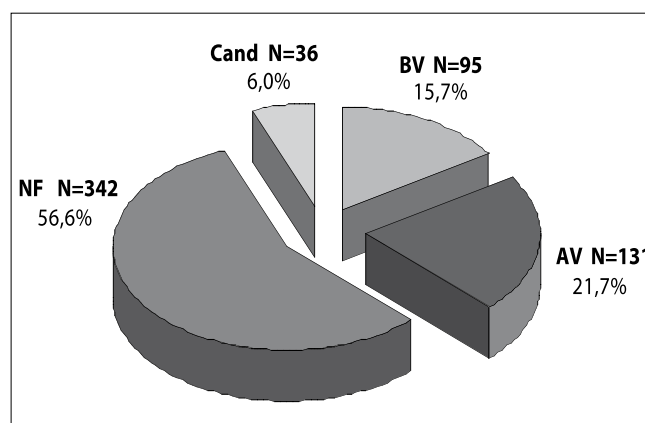
Identyfikację wyhodowanych bakterii przeprowadzono za pomocą testów API (BioMerieux): API 20 STREP dla rodzajów *Streptococcus* i *Enterococcus*, API STAPH dla rodzaju *Staphylococcus*, API 20E dla *Enterobacteriaceae* i API 20A dla bakterii beztlenowych. Ponadto dla gatunku *Gardnerella vaginalis* identyfikacja fenotypowa weryfikowana była za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Reakcję PCR przeprowadzano według metody opisanej w publikacji Obata-Yasuoka i wsp. przy użyciu gatunkowo swoistych starterów [19]. Do izolacji genomowego DNA bakterii wykorzystano kolumnkowy zestaw firmy DNA Gdańsk, a procedura izolacji prowadzona była zgodnie z zaleceniami producenta. W ten sposób zebrano kolekcję 89 szczepów *Gardnerella vaginalis*, które przechowywano w temperaturze -70°C w płynnym podłożu Schädlera (Difco) z dodatkiem 15% glicerolu.

Dla wszystkich zidentyfikowanych szczepów *Gardnerella vaginalis* oznaczono wrażliwość na metronidazol, klindamycynę i amoksycylinę z kwasem klawulanowym. Lekooporność szczepów oznaczana była gradientowo-dyfuzyjną metodą E-test (BioMerieux) w celu oznaczenia wartości MIC, czyli najmniejszego stężenia antybiotyku hamującego wzrost drobnoustroju. Zawiesziny szczepów *Gardnerella vaginalis* o gęstości 1 McFarlanda posiewano na podłoże Columbia Blood Agar Base, a następnie nakładano na nie paski nasyczone lekami i inkubowano w wa-

runkach beztlenowych w temperaturze 37°C przez 48 godzin. Interpretację uzyskanych wyników przeprowadzono w oparciu o kryteria Europejskiej Komisji Testowania Wrażliwości Drobnoustrojów (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing* – EUCAST) [20]. Do kontroli wykonywanych badań użyto szczepu wzorcowego *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018.

Wyniki

Badania mikrobiologiczne wykazały, że u 95 (15,7%) spośród 604 kobiet biorących udział w badaniu rozpoznano bakteryjną waginozę, a u 131 (21,7%) tlenowe zapalenie pochwy (*aerobic vaginitis*, AV) będące niedawno opisaną postacią bakteryjnego zakażenia pochwy, w którym dochodzi do niekontrolowanego wzrostu liczby bakterii tlenowych, takich jak: *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, czy *Klebsiella pneumoniae* z jednoczesnym zmniejszeniem populacji *Lactobacillus spp.*. W przypadku stosowania skali Nugenta tego typu bakteryjne zakażenie pochwy daje wynik wątpliwy, czyli przyjmuje wartość od 4 do 6 punktów [3]. U 36 (6%) kobiet rozpoznano grzybicze zapalenie pochwy, natomiast prawidłową florę bakteryjną pochwy stwierdzono u 342 (56,6%) uczestniczek badania. Wyniki tych badań przedstawia rycina 1.



Rycina 1. Procentowy rozkład populacji kobiet z bakteryjną waginozą (BV), tlenowym zapaleniem pochwy (AV), normalną florą (NF) i grzybiczym zapaleniem pochwy (Cand) (N=604).

Obecność *Gardnerella vaginalis* wykryto u 89 (94%) spośród 95 kobiet ze zdiagnozowaną bakteryjną waginozą. Z zebranej kolekcji szczepów *Gardnerella vaginalis* udało się utrzymać 67 i właśnie na tej grupie przeprowadzono badanie wrażliwości na metronidazol, klindamycynę i amoksycylinę z kwasem klawulanowym.

Minimalne stężenie hamujące dla metronidazolu zawierało się pomiędzy wartością 0,19 mg/l a >256 mg/l. Na podstawie interpretacji otrzymanych wartości MIC w oparciu o standard EUCAST dla bakterii beztlenowych stwierdzono 21 (31,3%) szczepów *Gardnerella vaginalis* wrażliwych na metronidazol (MIC 0,19 – 4 mg/l) i 46 (68,7%) szczepów opornych na ten antybiotyk (MIC 8 – >256 mg/l). Wszystkie badane szczepy charakteryzowały się wysoką wrażliwością na klindamycynę (zakres wartości MIC: 0,016 – >256 mg/l). Tylko 1 (2,2%) szczep był oporny (MIC >256 mg/l), natomiast 66 (97,8%) szczepów

Tabela I. Zakresy wartości MIC (mg/l) dla metronidazolu, klindamycyny i amoksycyliny z kwasem klawulanowym oraz liczba i procent szczepów *Gardnerella vaginalis* opornych lub wrażliwych na zastosowane antybiotyki.

ANTYBIOTYK	ZAKRES WARTOŚCI MIC [mg/l]	WARTOŚCI GRANICZNE MIC wg KRYTERIÓW EUCAST [mg/l]	LICZBA I ODSETEK SZCZEPÓW (N=67)
METRONIDAZOL	0,19 - >256	W ≤ 4	21* (31,3%)
		O > 4	46 (68,7%)
KLINDAMYCYN	0,016 - >256	W ≤ 4	66 (97,8%)
		O > 4	1 (2,2%)
AMOKSYCYLINA Z KWASEM KŁAWULANOWYM	0,016 – 1,0	W ≤ 4	67 (100%)
		O > 8	

Oznaczenia: * – liczba szczepów, () – odsetek szczepów, W – wrażliwy, O – oporny

było wrażliwych na klindamycynę (MIC 0,016 – 0,25 mg/l). W przypadku amoksycyliny z kwasem klawulanowym wszystkie analizowane szczepy (67) były wrażliwe na ten lek (zakres wartości MIC: 0,016 – 1,0 mg/l). Dane dotyczące zakresów MIC wraz z liczbowym i procentowym udziałem szczepów wrażliwych lub opornych na zastosowane antybiotyki przedstawiono w tabeli I. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że wśród szczepów opornych na metronidazol, 80,4% (37 szczepów) stanowiły szczepy wysoce oporne na ten lek (MIC >256mg/l).

Dyskusja

W literaturze pojawia się w ostatnim czasie coraz więcej doniesień wskazujących na zwiększanie się odsetka szczepów bakterii z gatunku *Gardnerella vaginalis* opornych na metronidazol. Badania przeprowadzone w 1993 r. przez Goldstein'a i wsp. wykazały, że odsetek szczepów *Gardnerella vaginalis* opornych na metronidazol wynosił wówczas 20%. W roku 2002 ta sama grupa badaczy zaobserwowała wzrost odsetka szczepów opornych na ten antybiotyk do 29% [21]. Najnowsze doniesienia pokazują, że proces nabywania oporności na metronidazol narasta w znacznym tempie. Badania lekooporności szczepów *Gardnerella vaginalis* opublikowane w 2007 r. wykazały, że aż 70% (tj. 66 z 94 badanych szczepów) nabyło oporność na metronidazol [15]. Podobny odsetek (68%) opornych szczepów należących do tego gatunku wykazała w 2008 r. grupa badaczy z Kuwejtu [14]. Przeanalizowali oni w sumie 50 szczepów, z czego wszystkie oporne na metronidazol zostały wyizolowane z pochwy kobiet cierpiących z powodu częstych nawrotów BV. Uzyskane przez nas wyniki badań również wskazują na znaczny odsetek szczepów *Gardnerella vaginalis* opornych na metronidazol; wyniósł on aż 68,7%. Ponadto dla 80,4% szczepów opornych, wartość minimalnego stężenia hamującego ich wzrost przekraczała 256mg/l.

Jak podaje piśmiennictwo, istnieje kilka możliwych mechanizmów wytwarzania przez bakterie beztlenowe oporności na metronidazol. Mechanizmy te obejmują ograniczoną absorpcję leku, jego aktywne usuwanie z wnętrza komórki bakteryjnej na zasadzie pompy, inaktywację chemioterapeutyku oraz wzrost naprawy uszkodzeń DNA, które powstały pod wpływem działania leku [22]. U różnych gatunków bakterii beztlenowych opisano również istnienie specyficznych genów oporności (*nim*). Geny te (7 wariantów: *nimA* – *nimG*) związane są głównie z wytwarzaniem mechanizmu oporności na nitroimidazol.

Kodują one alternatywną reduktazę, która przekształca nitroimidazol w jego nietoksyczną pochodną, co zapobiega uszkodzeniu DNA komórki bakteryjnej [23,24]. Geny *nim* mogą być również odpowiedzialne za wytwarzanie oporności na metronidazol u bakterii z rodzaju *Bacteroides* [25]. Jak dotąd brakuje doniesień opisujących mechanizm powstawania oporności na ten antybiotyk wśród szczepów *Gardnerella vaginalis*. Być może w związku z obserwowanym na całym świecie procesem narastania częstości oporności tych bakterii na metronidazol uda się w najbliższym czasie wyjaśnić, czy również odpowiedzialne są za niego geny *nim*, czy też funkcjonują tu inne geny kodujące nieznaną dotąd mechanizmy oporności.

Pomimo niepokojących doniesień dotyczących narastającego odsetka drobnoustrojów opornych na metronidazol jest on nadal standardowym lekiem zalecanym w terapii BV. Jego zakres przeciwbakteryjnego działania obejmuje większość beztlenowych bakterii, które są izolowane z dróg rodnych kobiet z BV. Zaletą tego antybiotyku jest również fakt, że beztlenowe laseczki kwasu mlekowego z rodzaju *Lactobacillus* są całkowicie na niego oporne [16]. Ponadto jest lekiem tanim, łatwo dostępnym i zazwyczaj dobrze tolerowanym przez pacjentki.

Obecnie jednak coraz częściej w terapii BV stosowana jest, jako lek bardziej skuteczny, klindamycyna. W tym badaniu niemal wszystkie szczepy (97,8%) *Gardnerella vaginalis* odznaczały się wrażliwością na ten chemioterapeutyk. Wyniki innych badań również potwierdzają wysoką aktywność przeciwbakteryjną klindamycyny wobec bakterii z gatunku *Gardnerella vaginalis* [25,26]. Niestety słabą stroną stosowania tego antybiotyku są częste przypadki grzybicy sromu, czy pochwy, co prawdopodobnie ma związek z wrażliwością laseczek z rodzaju *Lactobacillus* na klindamycynę [16].

Alternatywą w leczeniu BV może stać się w przyszłości amoksycylina z kwasem klawulanowym, która stosowana jest obecnie jako lek drugiego rzutu w terapii tego schorzenia. Wyniki przeprowadzonych przez nas badań w warunkach *in vitro* wykazały wrażliwość wszystkich analizowanych szczepów *Gardnerella vaginalis* na ten antybiotyk. Amoksycylina z kwasem klawulanowym jest ponadto lekiem I rzutu zalecanym wobec najczęstszych bakterii spotykanych w przypadkach tlenowego zapalenia pochwy (AV), jak *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, czy *Escherichia coli* [3]. W związku z powyższym antybiotyk ten mógłby stać się lekiem zalecanym w terapii zakażeń pochwy wywołanych przez mieszaną florę bakteryjną.

Lekowrażliwość szczepów *Gardnerella vaginalis* wyizolowanych z przypadków bakteryjnej waginazy.

Istnieje jednakże potrzeba przeprowadzenia kontrolowanych badań klinicznych, rzetelnie oceniających skuteczność amoksycyliny z kwasem klawulanowym wobec bakterii beztlenowych, gdyż badania przeprowadzone do tej pory obejmowały małe liczebnie grupy pacjentek [17]. W opisywanym tu badaniu takich analiz również nie prowadzono.

Narastająca częstość oporności bakterii *Gardnerella vaginalis* na metronidazol ogranicza możliwość skutecznego leczenia BV i prawdopodobnie przyczynia się do zwiększenia częstości nawrotów objawów klinicznych. Niewątpliwie istnieje potrzeba monitorowania rozprzestrzeniania się oporności na te antybiotyki w populacjach bakterii będących najważniejszymi czynnikami etiologicznymi BV. Dynamicznie zwiększający się odsetek szczepów opornych zwłaszcza na metronidazol może za jakiś czas doprowadzić do zmiany zaleceń w leczeniu BV.

Wnioski

1. Uzyskane wyniki wskazują na wysoki odsetek szczepów *Gardnerella vaginalis* opornych na wysokie stężenia metronidazolu.
2. Klindamycyna oraz amoksycylina z kwasem klawulanowym wykazują dużą aktywność wobec Gram-ujemnych pałeczek *Gardnerella vaginalis*.

Podziękowania

Autorzy składają serdeczne podziękowania personelowi ambulatorium Pracowni Diagnostycznej Katedry Mikrobiologii CMUJ za współpracę i pomoc w przeprowadzeniu badań.

Piśmiennictwo

1. Romanik M, Ekiel A, Tomana L, Martirosian G. Waginaza bakteryjna – problemy terapii. *Wiad Lek.* 2007, 60, 64-66.
2. Livengood C. Bacterial vaginosis: an overview for 2009. *Rev Obstet Gynecol.* 2009, 2, 28-37.
3. Drzewiecki A, Strus M, Heczko P. Bakteryjna waginoza i zapalenie pochwy wywołane przez bakterie tlenowe. Diagnostyka i leczenie. *Med Prakt Ginek.* 2005, 6, 34.
4. Joesoef M, Wiknjosastro G, Norojono W, [et al.]. Coinfection with chlamydia and gonorrhoea among pregnant women with bacterial vaginosis. *Int J STD AIDS.* 1996, 7, 61-64.
5. Martin H, Richardson B, Nyange P, [et al.]. Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. *J Infect Dis.* 1999, 180, 1863-1868.
6. Romanik M, Martirosian G. Częstość występowania, kryteria diagnostyczne i następstwa bakteryjnego zakażenia pochwy u kobiet ciężarnych. *Przegl Epidemiol.* 2004, 58, 547-553.
7. Hay P, Lamont R, Taylor-Robinson D, [et al.]. Abnormal bacterial colonisation of the genital tract and subsequent preterm delivery and late miscarriage. *BMJ.* 1994, 308, 295-298.
8. Greaves W, Chungafung J, Morris B, [et al.]. Clindamycin versus metronidazole in the treatment of bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol.* 1988, 72, 799-802.
9. Ferris D, Litaker M, Woodward L, [et al.]. Treatment of bacterial vaginosis: a comparison of oral metronidazole, metronidazole vaginal gel and clindamycin vaginal cream. *J Fam Pract.* 1995, 41, 443-449.
10. Austin M, Beigi R, Meyn L, Hillier A. Microbiologic response to treatment of bacterial vaginosis with topical clindamycin or metronidazole. *J Clin Microbiol.* 2005, 43, 4492-4497.
11. Sobel J, Schmitt C, Meriweather C. Long term follow-up of patients with bacterial vaginosis treated with oral metronidazole and topical clindamycin. *J Infect Dis.* 1993, 167, 783-784.
12. Ferris M, Masztal A, Aldridge K, [et al.]. Association of Atopobium vaginae, a recently described metronidazole resistant anaerobe, with bacterial vaginosis. *BMC Infect Dis.* 2004, 4, 5.
13. Bahar H, Torun M, Ocer F, Kocazeybek B. Mobiluncus species in gynaecological and obstetric infections: antimicrobial resistance and prevalence in a Turkish population. *Int J Antimicrob Agents.* 2005, 25, 268-271.
14. Nagaraja P. Antibiotic resistance of Gardnerella vaginalis in recurrent bacterial vaginosis. *Indian J Med Microbiol.* 2008, 26, 155-157.
15. Tosun I, Alpaya Karaoglu S, [et al.]. Biotypes and antibiotic resistance patterns of gardnerella vaginalis strains isolated from healthy women and women with bacterial vaginosis. *Mikrobiyol Bul.* 2007, 41, 21-27.
16. Danielsen M, Wind A. Susceptibility of Lactobacillus spp. to antimicrobial agents. *Int J Food Microbiol.* 2003, 82, 1-11.
17. Symonds J, Biswas A. Amoxycillin, augmentin and metronidazole in bacterial vaginosis associated with Gardnerella vaginalis. *Genitourin Med.* 1986, 62, 136.
18. Nugent R, Krohn M, Hillier S. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. *J Clin Microbiol.* 1991, 29, 297-301.
19. Obata-Yasuoka M, Ba-Thein W, Hamada H, Hayashi H. A multiplex polymerase chain reaction – based diagnostic method for bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol.* 2002, 100, 759-764.
20. EUCAST clinical MIC breakpoints. www.escmid.org
21. Goldstein E, Citron D, Meriam C, [et al.]. In vitro activities of Garenoxacin (BMS 284756) against 108 clinical isolates of Gardnerella vaginalis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002, 46, 3995-3996.
22. Löfmark S, Edlund C, Nord C. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. *Clin Infect Dis.* 2010, 50, 16-23.
23. Löfmark S, Fang H, Hedberg M, Edlund C. Inducible metronidazole resistance and nim genes in clinical Bacteroides fragilis group isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005, 49, 1253-1256.
24. Leiros H, Kozielski-Stuhmann S, Kapp U, [et al.]. Structural basis of 5-nitroimidazole antibiotic resistance: the crystal structure of NimA from Deinococcus radiodurans. *J Biol Chem.* 2004, 279, 55840-55849.
25. Shanker S, Toohey M, Munro R. In vitro activity of seventeen antimicrobial agents against Gardnerella vaginalis. *Eur J Clin Microbiol.* 1982, 1, 298-300.
26. Kharsany A, Hoosen A, van den Ende J. Antimicrobial susceptibilities of Gardnerella vaginalis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993, 37, 2733-2735.